

Ein Mikro-Verfahren zur Eisen- und Kupferbestimmung mittels Durchflußanalyse bei linearisierter Extinktionsmessung

Von H. HIRSCH

Aus dem Zentrallabor (Chefarzt: Dr. W. Fritzsche) des Stadtkrankenhauses Frankfurt/Main-Höchst

Technische Assistenz: H. SCHENKEL, I. UNGER und D. PICINIC

(Eingegangen am 4. Juli/4. September 1973)

Aus Bauteilen der sog. I. Autoanalyzer-Generation und einem Eppendorf-Photometer mit Schreiber wurde eine Continuous-flow-Konfiguration zusammengestellt, in der nacheinander, unter Verwendung des identischen Schlauchsatzes, Serum-Eisen und -Kupfer analysiert werden. Durch eine lineare Konzentration-Extinktionsbeziehung vereinfacht sich die Standardisierung auf das Schätzen einer Geraden durch die Standardpeaks. Bei einem minimalen Verbrauch an Untersuchungsmaterial und einer Frequenz von 40 Proben/h ist die Verschleppung beim Kupfer immer, beim Eisen bis auf wenige Fälle vernachlässigbar. Die erreichte Reproduzierbarkeit ist befriedigend. Hämolyse und der Verzicht auf spezielle eisenfreie Gefäße hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Ergebnisse der Eisenanalyse.

A micro method for the determination of iron and copper with the aid of continuous flow analysis with linearized measurements of extinction

A continuous flow procedure for the successive determination of serum iron and serum copper, using the same tubing, was devised with the aid of a first generation autoanalyzer and an Eppendorf photometer with a chart recorder. There is a linear relationship between concentration and extinction so that standardization is simplified to the measurements of a slope through the standard peak. With the minimal consumption of test material and a frequency of 40 samples/h, the carry over is always negligible for copper and, with a few exceptions, for iron. The reproducibility is satisfactory. Haemolysis and the use of special iron-free vessels had no detectable effect on the results from the analysis of iron.

Die hohe Zuwachsrate der in unserem Labor durchgeführten Eisen- und Kupferbestimmungen im Serum stellte uns vor die Aufgabe, diese zu mechanisieren. Zur Verfügung stand eine Autoanalyzer-Konfiguration der sog. I. Generation. Methodenblätter des Geräteherstellers für Eisen- und Kupfer-Bestimmungen existieren für den Autoanalyzer I nicht, jedoch wurden besonders für das Eisen immer wieder neue Arbeitsvorschriften von verschiedenen Autoren (z. B. 1—11) veröffentlicht — bereits Hinweise auf die Problematik der Analyse dieser beiden Spurenelemente auf diesem Gerät.

In jüngster Zeit haben KATTERMANN und KÖHRING (10) sowie BERNEGGER et al. (11) Autoanalyzer-I-Fließschemata für das Serum-Eisen und -Kupfer vorgestellt. KATTERMANN und KÖHRING analysieren parallel in einem Zweikanalverfahren, wobei als Komplexbildner für das Eisen das Bathophenanthrolin und das Oxalyl-dihydrazid für das Kupfer verwendet werden. Erhebliche Nachteile dieses Verfahrens sind der große apparative Aufwand und der Serumbedarf von etwa 3 ml. BERNEGGER et al. bestimmen Eisen und Kupfer konsekutiv auf einem Einkanalgerät mit einer Frequenz von 30 Proben/h unter Verwendung eines weitgehend identischen Fließschemas. Die Chemie entspricht dabei im Prinzip der bei KATTERMANN und KÖHRING beschriebenen, jedoch wird als Chelatbildner für das Eisen das „HLR 7777“, ein Benzodiazepin, verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgt in einer 50 mm-

Durchflußküvette, wodurch der Einsatz von 0,4 ml Serum pro Analyse genügt.

Es war erstrebenswert bzw. notwendig, das letztere, uns im Prinzip zusagende Verfahren in einigen Punkten zu modifizieren:

1. Der auf dem Markt nicht mehr erhältliche Farbstoff „HLR 7777“ mußte durch einen geeigneten anderen ersetzt werden. Naheliegend war die Verwendung von Bathophenanthrolin (6, 9, 12). Da wir jedoch aus bisher noch nicht geklärten Gründen gelegentlich (entgegen 12, 13) auch im sauren pH-Bereich eine Interferenz des Kupfers mit der Eisen-Bathophenanthrolinreaktion beobachtet haben (14), entschieden wir uns für das Ferrozin (1, 9, 15, 16), bei dem sich die Interferenz des Kupfers durch dessen Bindung an Neocuproin abschwächen läßt (16). Als weiteren Vorteil besitzt das Ferrozin gegenüber dem Bathophenanthrolin einen um etwa 20% höheren Extinktionskoeffizienten (16).

2. Die notwendigen Investitionen für den Kauf von Filtern und die Umrüstung auf eine 50 mm-Küvette erschienen für das als überholt zu bezeichnende Kolorimeter I als unverhältnismäßig hoch. Wir ersetzten deshalb das Kolorimeter durch ein Spektrallinien-Photometer mit einer 2 cm-Durchflußküvette. Durch die Messung der Extinktion bei monochromatischem Licht sollte außerdem eine für die Praxis ausreichend lineare Konzentration-Extinktionsabhängigkeit erreicht werden.

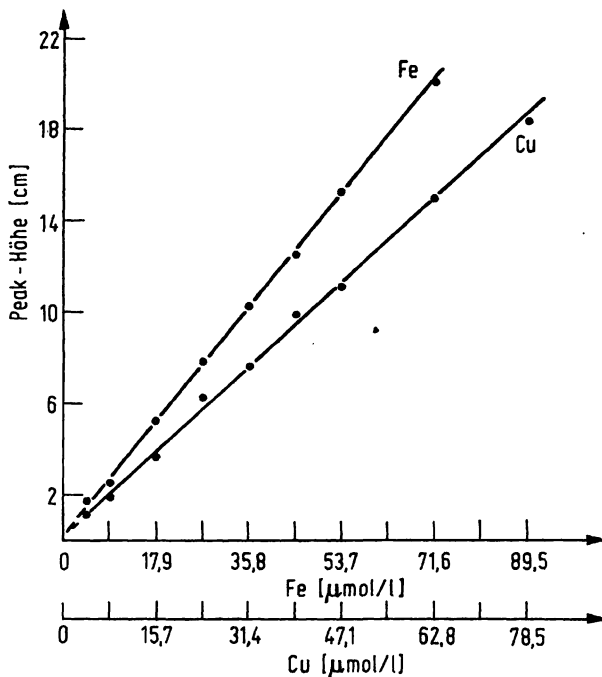


Abb. 2

Korrelation zwischen Konzentration und Peakhöhe bei je einer Reihe primärer Standards. Korrelationskoeffizienten und Regressionsgeraden: Fe: $r = 0,9996$, $y = 0,273 x + 0,22$; Cu: $r = 0,9988$, $y = 0,235 x + 0,22$

zentrationsbereiche. Bei der graphischen Resultatermittlung vereinfacht sich dadurch die Standardisierung auf das Schätzen einer Geraden, die mit Hilfe eines Lineals durch die Peaks der Standards gezogen wird. Mathematisch lassen sich die Analysenergebnisse nach Ausmessen der Peaks durch Vergleich mit einem Standardpeak, bzw. bei Vorhandensein eines programmierbaren Tischrechners durch Einsetzen in die Ausgleichsgerade schnell berechnen. Über das zuletzt genannte Verfahren wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermittelt.

Präzision in der Serie

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurden mehrere Poolseren verschiedener Konzentration je 15-fach in einer Serie analysiert. Die Ergebnisse gibt Tabelle 1 wieder.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde einmal geschätzt aus einer Kurzzeitserie, in der 12 Misch- bzw. Richtigkeitskontrollseren an zehn verschiedenen Tagen innerhalb von drei Wochen analysiert wurden und zum anderen aus der täglichen statistischen Qualitätskontrolle mit einem Richtigkeitskontrollserum der Behringwerke (Charge 114 A). Die Ergebnisse der Kurzzeitserie zeigt Tabelle 1. Es fallen beim Eisen wie beim Kupfer z. T. stark differierende Variationskoeffizienten auf. Da jeder Schätzung jedoch nur zehn Einzelwerte zugrunde liegen, kann man daraus nicht auf eine unterschiedliche Qualität der Kontrollseren schließen. Eine Korrelation zwischen den Mittelwerten und den Variationskoeffizienten besteht nicht ($r = -0,207$ für Fe und $-0,037$ für Cu). Es wurden deshalb aus den je 12 Variationskoeffizienten die Mittelwerte berechnet, die der wahren Reproduzierbarkeit dieser Kurzzeitserie nahe kommen dürften. Aus dem bei der täglichen statistischen Qualitätskontrolle angefallenen Datenmaterial der Monate März bis Juni 1973 wurde für das Eisen ein VK von 5,7% bei einem Mittelwert von $15,3 \mu\text{mol/l}$ und für das Kupfer ein VK von 4,5% bei einem Mittelwert von $19,8 \mu\text{mol/l}$ berechnet.

Die gering schlechtere Reproduzierbarkeit der Monate März bis Juni kann durch Einflußfaktoren, wie Personalwechsel, Inkonzanz der Reagenzien, Veränderungen am Fließsystem, z. B. Pumpenschlauchwechsel, erklärt werden, die in einer 4-Monatsperiode natürlich zahlreicher zum Tragen kommen als in drei Wochen. Die

Tab. 1
Präzision in der Serie und von Tag zu Tag

	Präzision in der Serie (n = 15)				Präzision von Tag zu Tag (n = 10)			
	Eisen		Kupfer		Eisen		Kupfer	
	\bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	VK %	\bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	VK %	\bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	VK %	\bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	VK %
Verschiedene humane Poolseren	37,1	0,85	33,9	1,34				
	27,4	1,11	20,7	2,07				
	15,9	0,66	15,7	1,54				
	8,8	0,75	11,0	2,31				
	5,4	2,01						
Monitrol 119					10,7	3,4	34,9	4,2
Monitrol 109					49,6	4,0	57,9	3,2
Monitrol 29					15,2	5,1	18,7	3,6
Hyland 3699M005A1					17,5	5,0	18,5	2,6
Asid 401					35,0	5,1	13,2	4,5
Asid 402					20,8	5,0	18,2	2,8
Behring 106					14,9	2,7	17,1	7,9
Behring 114					18,6	4,9	21,3	3,2
Precinorm S 001					23,4	4,5	23,0	3,2
Seronorm 118					15,0	7,4	19,5	5,2
\bar{x} der Variationskoeffizienten von Tag zu Tag:					19,7	4,1	22,3	4,4
					28,8	5,1	16,3	3,5
						4,7		4,0

Reproduzierbarkeit ist übereinstimmend mit KATTERMANN und KÖHRING und BERNEGGER et al. beim Eisen schlechter als beim Kupfer. Die ausgezeichneten Variationskoeffizienten von BERNEGGER et al. (für Fe etwa 3,9%, für Cu etwa 1,7%) werden bei unserem Verfahren zwar nicht erreicht, jedoch halten wir im Routinelaboratorium Variationskoeffizienten um 5% bei Parametern wie Eisen und Kupfer, die interindividuell und im Falle des Eisens auch intraindividuell so stark streuen, für ausreichend.

Verschleppung

Bei Serum-Eisen- und -Kupferanalysen ist in besonderem Maße auf die Verschleppung zu achten, da sehr niedrige Konzentrationen auf sehr hohe und umgekehrt folgen können. Von den zitierten Arbeiten (1–11) wird nur in (10) auf die Verschleppung eingegangen; Berechnungen in Form eines Verschleppungskoeffizienten wurden auch in (10) nicht angegeben. Wir haben die prozentualen Verschleppungskoeffizienten nach HJELM (17) berechnet, wobei wir von Poolseren mit Konzentrationen von 43,3 und 3,9 $\mu\text{mol/l}$ Fe und 41,8 und 3,9 (Poolserumverdünnung mit Albuminlösung) $\mu\text{mol/l}$ Cu ausgingen. Die sehr günstigen Ergebnisse zeigt Tabelle 2. Schließt man sich der Forderung von HAECKEL und PORTH (18) an, daß der durch Verschleppungseffekte bedingte Fehler nicht größer als die zweifache Standardabweichung in der Serie sein darf, so kann man mit Hilfe der Verschleppungskoeffizienten für jeden Wert, für den die Standardabweichung in der Serie (Tab. 1) bekannt ist, Faktoren berechnen, um die die Konzentration der vorhergegangenen Probe größer bzw. kleiner sein darf, ohne daß die Verschleppung berücksichtigt werden muß, woraus sich verschleppungssichere Bereiche konstruieren lassen (zum Verfahren siehe bei (18)). Wenn, wie bei den Parametern Eisen und Kupfer, aus einem pathologischen Wert nur therapeutische Maßnahmen resultieren, die in ihrer Quantität nicht unmittelbar von der Höhe des pathologischen Wertes abhängen, kann man für die Klinikroutine über die oben gesetzte Grenze hinaus Verschleppungsfehler dann zulassen, wenn sie nicht zur Fehlzuteilung eines Einzelwertes bezüglich des Norm-Kollektives führen. Unter diesen Voraussetzungen muß hier beim Kupfer der Verschleppungsfehler überhaupt nicht, beim Eisen nur dann berücksichtigt werden, wenn auf einen Wert von 34,0 $\mu\text{mol/l}$ und darüber ein Wert im Bereich zwischen 10,7 und 12,5 $\mu\text{mol/l}$ folgt.

Tab. 2

Prozentuale Verschleppungskoeffizienten nach HJELM

($Q = q \times 100$, Q_1 = Verschleppung von der niederen zur hohen, Q_2 = Verschleppung von der hohen zur niederen Konzentration), Mittelwerte aus je 12 Einzelwerten

	Q_1	Q_2
Eisen	1,69	0,69
Kupfer	0,98	0,83

Spezifität des Farbreagenzes

Nach STOOKEY (15) wird die Eisen-Ferrozin-Reaktion nur durch Kupfer beeinflusst. Bei 562 nm fand er in einem 17,9 $\mu\text{mol/l}$ Eisenstandard, dem 15,7 $\mu\text{mol/l}$ Kupfer zugemischt waren 18,4 $\mu\text{mol/l}$ (= 103%) Eisen, CHARTER (16) bei derselben Versuchsanordnung jedoch 20,0 $\mu\text{mol/l}$ (= 112%). Letzterer konnte durch einen Zusatz von Neocuproin zum Ferrozinfarbreagenz die Interferenz des Kupfers auf 103,5% abschwächen. Das Ergebnis eigener Untersuchungen (Pipettierschema: 0,5 ml Acetatpuffer, 0,2 ml Standard bzw. bidest. Wasser, 0,1 ml Farbreagenz; Reaktionszeit 10 min bei Raumtemperatur) gibt Tabelle 3 wieder, die zeigt, daß die geringste Kupferinterferenz bei 578 nm bei dem Farbreagenz mit Neocuproinzusatz beobachtet wird. Die unter den zuletzt genannten Bedingungen am Autoanalyzer gefundene Kupferinterferenz bestätigt den manuell ermittelten niedrigen Wert und ist deshalb vernachlässigbar. Die für die Farbentwicklung bei der Kupferanalyse notwendige Reaktionstemperatur von 50°C beeinflusst die Farbintensität des Eisen-Ferrozin-komplexes nicht.

Tab. 3

Einfluß von Kupfer auf die Eisen-Ferrozin-Reaktion. Die Tabelle zeigt die Menge Eisen in $\mu\text{mol/l}$ an, die ein Zusatz von 31,4 $\mu\text{mol/l}$ Cu zu einem 17,9 $\mu\text{mol/l}$ Eisenstandard vortäuscht

Meßwellenlänge	546 nm	578 nm
Ferrozinreagenz ohne Neocuproin-Zusatz	3,0	2,5
Ferrozinreagenz mit Neocuproin-Zusatz	0,79	0,32

Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden zunächst mehrere Richtigkeitskontrollseren analysiert, zur Eliminierung des Fehlers von Tag zu Tag an zehn verschiedenen Tagen. Die Mittelwerte wurden in je einem Korrelationsdiagramm in Abbildung 3 den Sollwerten gegenübergestellt. Abgesehen von den nicht berücksichtigten Punkten ist die Korrelation zwischen den gefundenen und den Sollwerten sehr gut. Die kleinen Ordinatenabschnitte sind mit der Annahme verträglich, daß die Geraden durch den Nullpunkt verlaufen. Die Eisenwerte liegen darin systematisch etwa 10% über den Sollwerten, die Kupferwerte dagegen etwa 10% darunter. Aufstockungsversuche an zufällig ausgewählten Patientenseren ergaben in Richtung und Größenordnung dieselben Abweichungen wie in der obigen Versuchsanordnung (Tab. 4). Dies ist insofern bemerkenswert, als KATTERMANN und KÖHRING sowie BERNEGGER et al. trotz der prinzipiellen Gleichartigkeit der Analysensysteme ebenfalls unter Verwendung wäßriger Standardlösungen solche Abweichungen nicht gefunden haben. KATTERMANN und KÖHRING haben beim Vergleich mit allerdings nur einem kommerziellen Kontrollserum für beide Methoden eine Abweichung von nur 1–2% gefunden. BERNEGGER et al. berichten: „Bei beiden Verfahren ist die Wiederfindung in Übereinstimmung zu den Literaturangaben voll befriedigend,

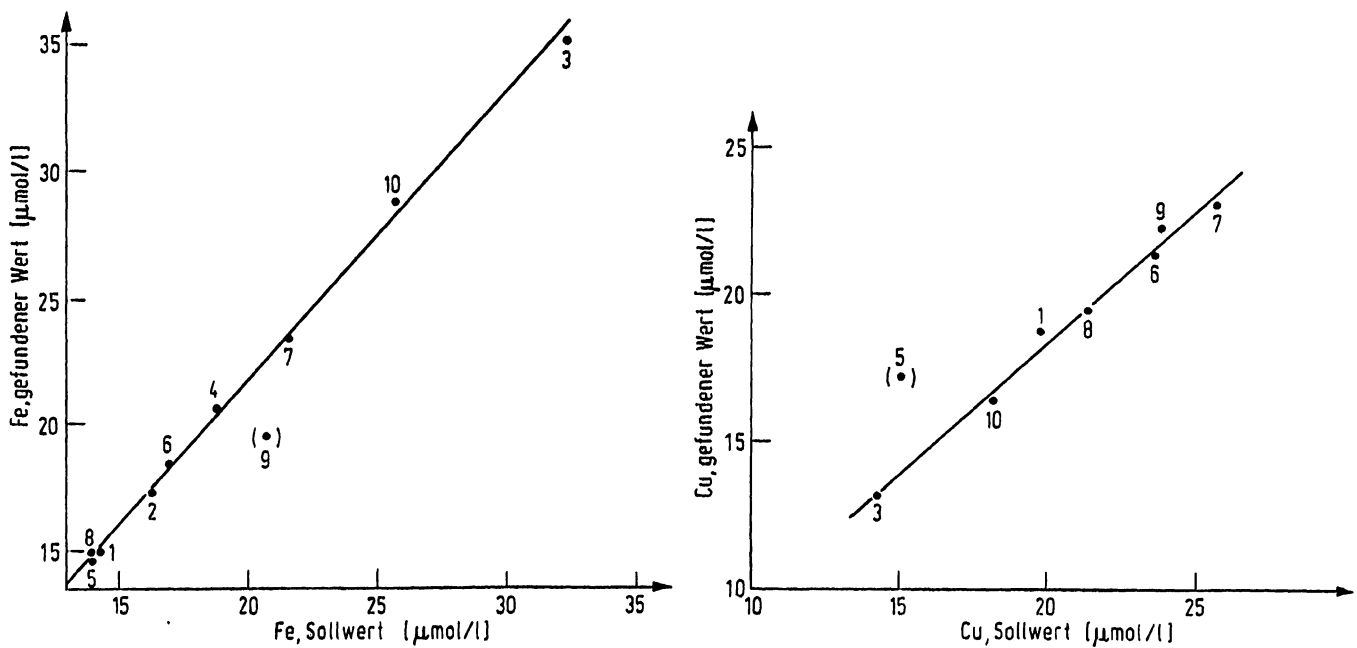


Abb. 3

Korrelation zwischen den Sollwerten verschiedener Richtigkeitskontrollseren und den gefundenen Werten. Die in Klammer gesetzten Punkte wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Fe: $r = 0,998$, $y = 1,109x + 0,41$; Cu: $r = 0,993$, $y = 0,899x + 0,42$. (1 = Monitrol 119, 2 = Monitrol 109, 3 = Monitrol 29, 4 = Hyland 3699M005A1, 5 = Asid 401, 6 = Asid 402, 7 = Behring 106, 8 = Behring 114, 9 = Precinorm S 001, 10 = Seronorm 118)

Tab. 4

Wiederfindung nach Zusatz von 16,2 μmol/l Fe bzw. 14,3 μmol/l Cu zu verschiedenen Humansera

	Eisen		Kupfer	
	μmol/l	%	μmol/l	%
Serum 1	17,9	110,4	13,2	92,3
Serum 2	18,1	111,7	13,4	93,7
Serum 3	17,5	108,0	13,4	93,7
Serum 4	18,3	112,9	12,8	89,5
Serum 5	17,6	108,6	12,4	86,7
Serum 6	17,6	108,6	12,4	86,7
Serum 7	17,9	110,4	12,7	88,8
Serum 8	17,9	110,4	13,0	95,1
Serum 9	18,6	114,8	13,1	91,6
Serum 10	18,0	111,1	13,4	93,7
\bar{x}	17,9	110,7	13,0	91,2

ihre Abweichungen vom Sollwert entsprechen der Streuung. Ein Aufstockversuch mit wäßrigen Lösungen ergab eine Wiederfindung von 99,7% für das Eisen und 98,9% für das Kupfer (Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen). Nach Mischen von Seren mit niedriger und hoher Fe- bzw. Cu-Konzentration in bestimmtem Verhältnis schwankte die Wiederfindung

nur wenig um 100% (Tab. 5). Seren verhalten sich demnach im System offensichtlich anders als wäßrige Lösungen. Als ideal muß deshalb eine Standardisierung mittels Seren angestrebt werden. Die Ergebnisse der Korrelations- und Regressionsberechnung aus Abbildung 3 rechtfertigen jedoch eine Korrektur der Resultate, für die wir uns — wie beschrieben — als vorläufig einfachste Lösung entschieden haben.

Hämolysc-Einfluß auf die Eisen-Bestimmung Zur Prüfung der Frage, in welchem Umfang aus Hämolysc stammendes Hämoglobineisen bei der vorliegenden Methode erfaßt wird, wurden Hämolysate mit Hb-Konzentrationen von 2,60, 1,30, 0,65 und 0,33 g/l Hb hergestellt und je vierfach analysiert. Bei 2,60 g/l Hb wurden 1,0 μmol/l Fe, bei 1,30 g/l Hb wurden 0,5 μmol/l Fe gefunden. Bei einer Hb-Konzentration von 0,65 g/l und darunter ist das Hämoglobineisen nicht mehr sicher nachweisbar. Auch in einem Zumischversuch bei 12 verschiedenen Seren, denen zu je 1 ml Serum 0,1 ml bidest. Wasser bzw. 0,1 ml Hämoglobininlösung entsprechend einer Endverdünnung von etwa 0,5 g/l Hb zugesetzt wurden, ergab sich im t-Test

Tab. 5

Wiederfindung nach Mischen zweier Seren in bestimmtem Verhältnis (Mittelwerte aus je drei Bestimmungen)

Mischverhältnis Serum A: Serum B	gefunden μmol/l	Eisen erwartet μmol/l	Wiederfindung %	gefunden μmol/l	Kupfer erwartet μmol/l	Wiederfindung %
1 : 0	11,4	—	—	10,5	—	—
3 : 1	19,5	19,6	100,0	14,5	14,8	98,1
2 : 1	24,5	22,4	99,6	16,2	16,2	100,3
1 : 1	26,8	27,9	104,1	18,7	18,9	98,7
1 : 2	33,7	33,3	98,8	21,9	21,8	100,5
1 : 3	35,7	36,0	101,0	23,3	23,2	100,4
0 : 1	44,3	—	—	27,4	—	—

für gepaarte Stichproben kein signifikanter Unterschied ($p > 0,4$). Da Hämoglobinkonzentrationen von über 0,65 g/l im Serum kaum und über 1,25 g/l nicht zu erwarten sind, braucht bei dieser Methode die Hämolyse nicht berücksichtigt werden.

Zur Notwendigkeit der Verwendung sog. eisenfreier Gefäße

Bei 40 Patienten wurde aus jeweils derselben Venenpunktion stammendes Blut bzw. Serum einmal nur mit „eisenfreien“ Glas- und Plastikgefäßen in Berührung gebracht und zum anderen in Glasröhrchen, wie sie sich üblicherweise bei uns in Umlauf befinden, transportiert und aufbewahrt. Die Serumeisenwerte wurden ermittelt und einander im t-Test für gepaarte Stichproben gegenübergestellt. Mit einem p-Wert von $> 0,60$ ist damit zumindest für unsere Glaswaren ein Einfluß auf die Serumeisenwerte äußerst unwahrschein-

lich. Wir verzichten deshalb für die beschriebene Methode auf die Verwendung sog. eisenfreier Röhrchen.

Benötigte Serummenge

Unseres Wissens ist bisher noch kein mechanisiertes Verfahren für die Eisen- und Kupferanalyse beschrieben worden, bei dem je Analyse nur 0,2 ml Serum verbraucht werden. Zusammen mit einer entfallenden Notwendigkeit besonderer Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit dem Probenmaterial dürfte damit das Bereitstellen eines eigenen Röhrchen Blutes für die Eisen- und Kupferanalyse meistens überflüssig werden. Darauf, daß die geringen benötigten Serum-mengen besonders in der Pädiatrie Vorteile bringen, braucht nicht besonders hingewiesen werden.

Danksagung

Herrn Dr. R. HELGER von der Fa. E. Merck, Darmstadt, danke ich für die freundliche Vermittlung des benötigten Ferrozin.

Literatur

1. HÜNTELER, J. L. A., VAN DER SLIK, W. & PERSIJN, J.-P. (1972), Clin. Chim. Acta 37, 391—397. — 2. FÜHR, J. & STARY, E. (1970), Ärztl. Lab. 16, 244—253. — 3. LEPLA, W., BROKATE, W. & KELLER, H. E. (1963), Internat. Techn. Sympos. Automat. Analyt. Chemie 225—229. — 4. SCHMIDT, R., WEIS, W., KLINGMÜLLER, V. & STAUDINGER, H. J. (1967), diese Z. 5, 304—309. — 5. YOUNG, D. S. & HICKS, J. M. (1965), J. Clin. Pathol. 18, 98—102. — 6. ZAK, B. & EPSTEIN, E. (1965), Clin. Chem. 11, 641—644. — 7. DELCOURT, R. (1964), Internat. Techn. Sympos. Automat. Analyt. Chemie 513—518. — 8. SUMMERS, R. M., MEFFERT, R. B., jr. & LITTLETON, H. R. (1964), Internat. Techn. Sympos. Automat. Analyt. Chemie 459—463. — 9. YEE, H. Y. & ZIN, A. (1971), Clin. Chem. 17, 950—953. — 10. KATTERMANN, R. & KÖHRING, B. (1971), diese Z. 9, 391—395. — 11. BERNEGGER, A., KELLER, H. & WENGER, R. (1972), diese Z. 10, 359—362. — 12. SMITH, G. F., MCCURDY, W. H., jr. & DIEHL, H. (1952), Analyst 77, 418—422. — 13. LANDERS, J. W. & ZAK, B. (1958), Amer. J. Clin. Pathol. 29, 590—592. — 14. HIRSCH, H., in Vorbereitung. — 15. STOOKEY, L. L. (1970), Anal. Chem. 42, 779—781. — 16. CARTER, P. (1971), Anal. Biochem. 40, 450—458. — 17. HJELM, M. (1968), Z. analyt. Chem. 243, 781—790. — 18. HAECKEL, R. & PORTH, A. J. (1972), diese Z. 10, 91—94.

Dr. H. Hirsch
Stadtkrankenhaus
623 Frankfurt-Höchst
Gotenstr.